

# Apoptóza - význam a regulace u nádorové buňky

RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.

23.3.2012

Oddělení cytokinetyky

Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.

Brno

- Které molekuly zapojené v regulaci apoptózy jsou nejslibnějším cílem protinádorové terapie a proč?

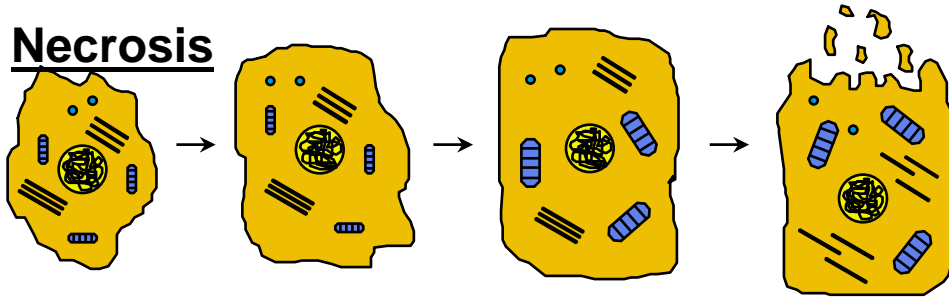
# Apoptóza a její význam

- Geneticky kontrolovaný proces cílené sebedestrukce buňky
- Eliminace nepotřebných, poškozených, nebezpečných, mutovaných či jinak pozměněných buněk za účelem udržení homeostázy mnohobuněčného organismu

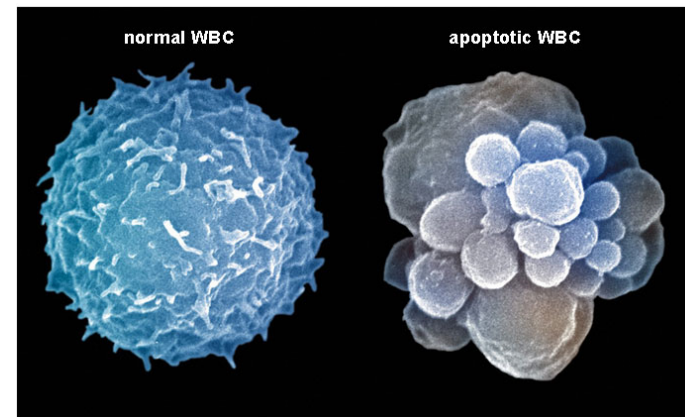
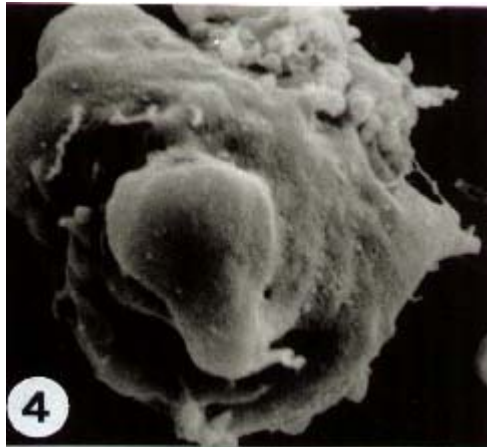
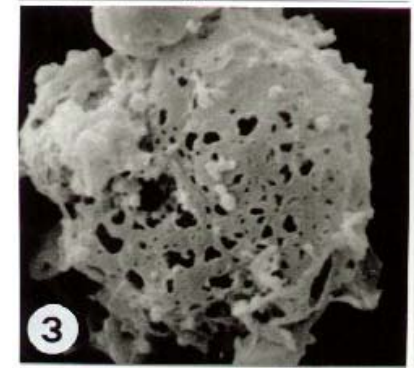
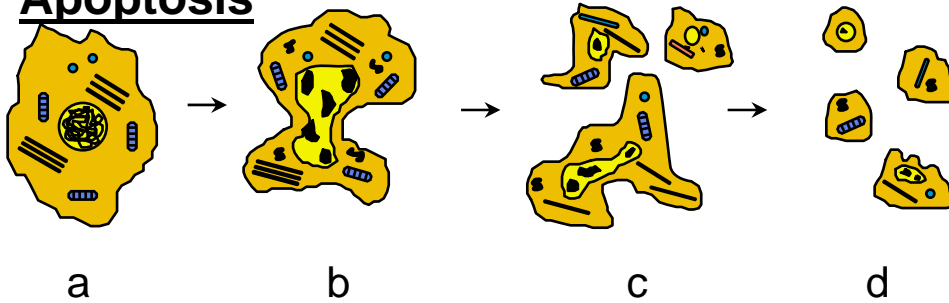
# Morfologie - nekróza vs. apoptóza

- ztráta integrity plazmatické membrány
- bobtnání cytoplazmy a zvětšení buňky
- rozbití jádra
- desintegrace buněčných organel
- kompletní lyze buňky
- bobtnání cytoplazmatické membrány, integrita membrány není porušena
- zmenšení velikosti buňky
- kondenzace a specifická fragmentace jaderného chromatinu
- udržení integrity intracelulárních organel
- formace tzv. apoptotických bodies

## Necrosis

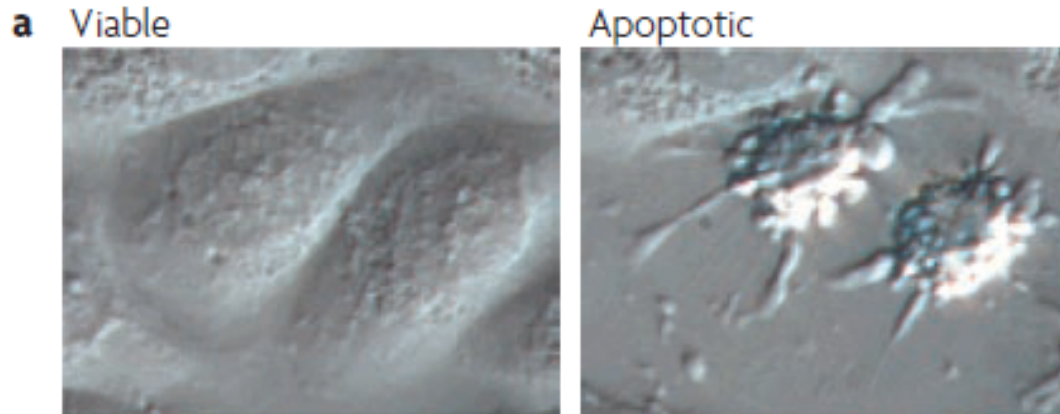


## Apoptosis



<http://spsscience.blogspot.com/2010/11/cell-even-die.html>

# Apoptosis



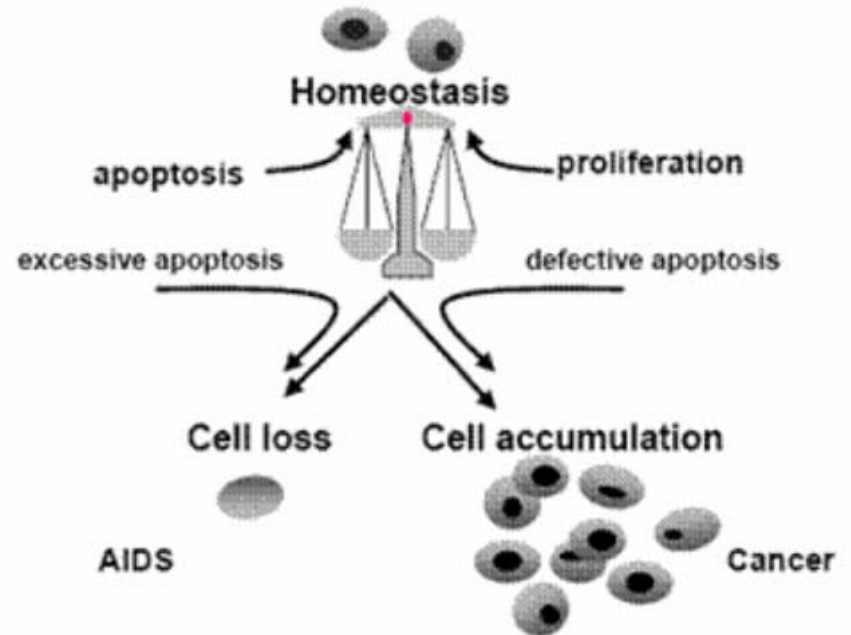
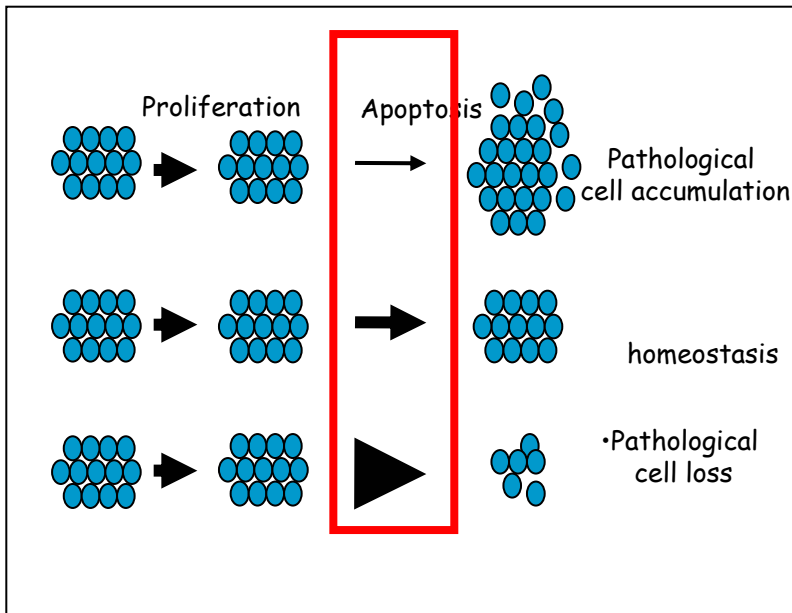
(Taylor RC, Cullen P, Martin SJ, 2008)

Hyršlová Vaculová A., 2012

# Nekróza versus apoptóza

- Postihuje skupiny buněk
- Indukována nefyziologickými stimuly
- Poškození okolní tkáně - vylití toxických látek
- Spouští zánět
- Týká se jednotlivých buněk
- Indukována fyziologickými stimuly
- Fagocytóza makrofágy
- Není zánět

# Crucial importance of balance between cell proliferation and death



(Zhivotovsky et al)

- deregulations... serious consequences...





# Apoptóza a nádorová onemocnění

- Nádorová onemocnění - nejvíce zkoumaný typ onemocnění v souvislosti s defekty apoptózy
- Charakteristický znak nádorových buněk - deregulace apoptózy - omezení spontánní apoptózy, rezistence k působení induktorů apoptózy („chybný apoptotický program“)
- Strategie protinádorová terapie - cílené spuštění apoptózy, eliminace nádorových buněk, bez poškození okolní zdravé tkáně organismu

## Hlavní problémy současné protinádorové terapie:

- Omezená selektivita, výrazné poškození zdravých tkání organismu
- Rezistence nádorových buněk

# Apoptóza

- Aktivace specifických molekul
  - kaspázy, nukleázy...
- Nutné dodání energie ve formě ATP
- Specifická fragmentace jaderné DNA
- Uvolnění specifických regulátorů z mitochondrií
- Změny symetrie membrán

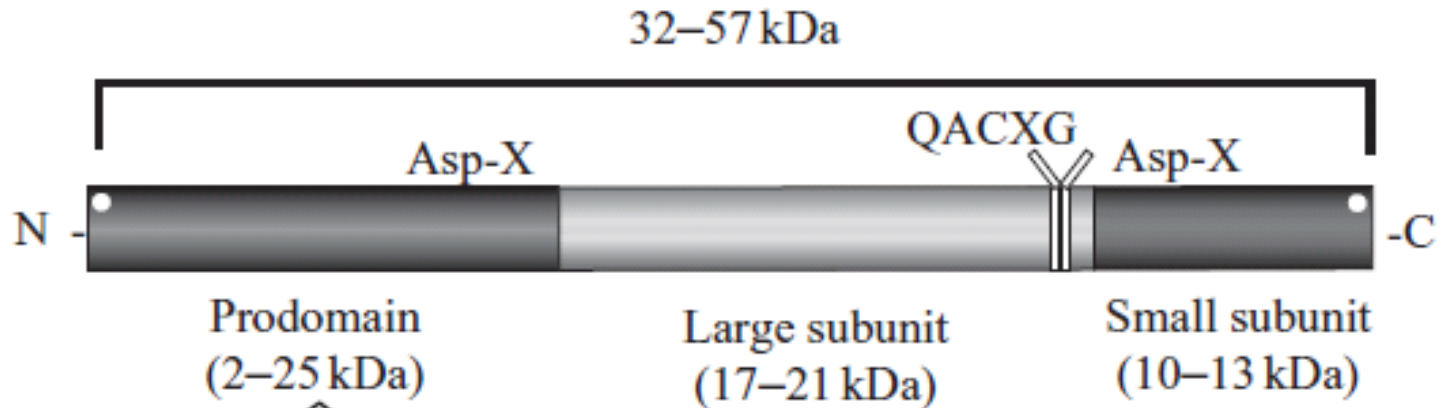
# Specifické proteiny v regulaci apoptózy

- Kaspázy
- Inhibitory kaspáz
- Proteiny rodiny Bcl-2
- Mediátory apoptózy uvolňované z mitochondrií

# Kaspázy

- cysteinové proteázy, specificky štěpí proteinové substráty v místě kyseliny asparagové
- klíčová úloha v přenosu apoptotického signálu
- v inaktivní formě (proenzymy, pro-kaspázy) v cytoplazmě
  - štěpením vzniká aktivní kaspáza schopná dále štěpit tzv. „death substráty“ a významně se tak podílet na šíření apoptotického signálu a exekuci apoptózy

# Kaspázy - klíčové regulátory apoptózy



Long

Short

Initiator caspases

Effector caspases

Caspase-2

Caspase-8

Caspase-9

Caspase-10

Caspase-3

Caspase-6

Caspase-7

„death substrates“

PIDDosome

DISC

apoptosome

(Vaculova et al., 2008)

Hyršlová Vaculová A., 2012

# Iniciační versus efektorové kaspázy

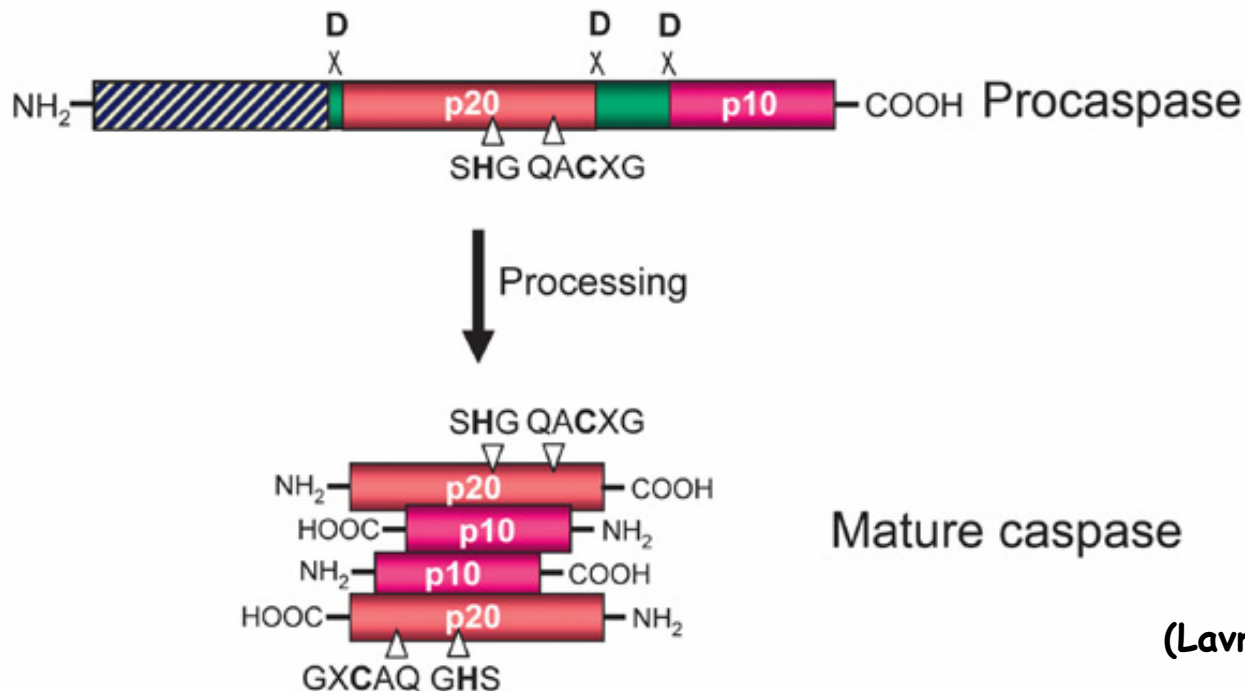
- Dlouhá prodoména
  - Monomery inaktivní
  - Aktivace na úrovni multiproteinových komplexů
  - Autokatalytické štěpení
- Krátká prodoména
  - Dimery inaktivní
  - Aktivace přímým štěpením iniciačními kaspázami
  - Není autokatalytické štěpení



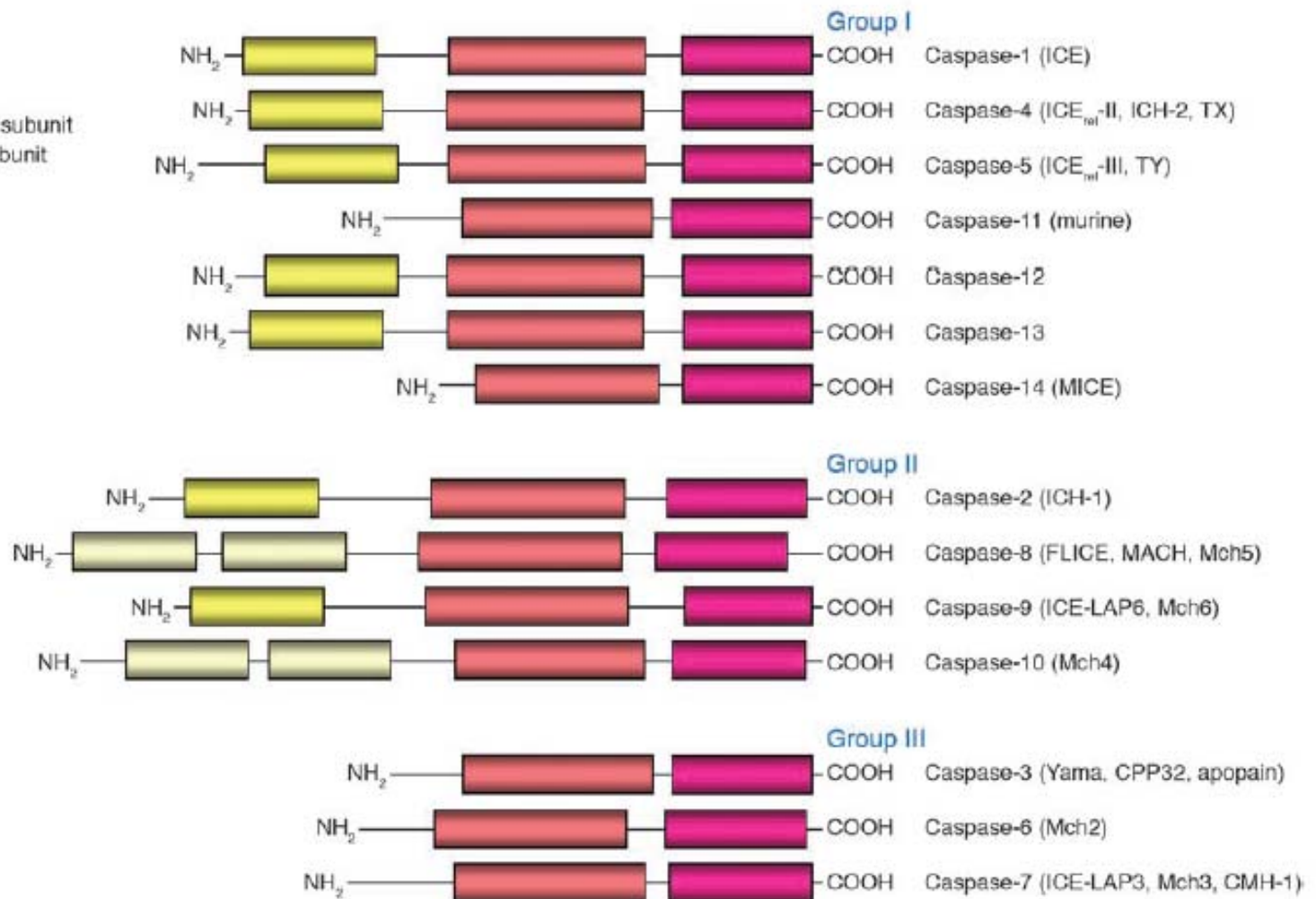
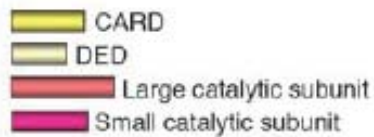
# Štěpení/aktivace kaspáz

Proteolytické štěpení v místech mezi malou a velkou katalytickou podjednotkou (Asp)

Aktivní kaspáza - heterotetramer ze dvou heterodimerů odvozených ze dvou původních molekul



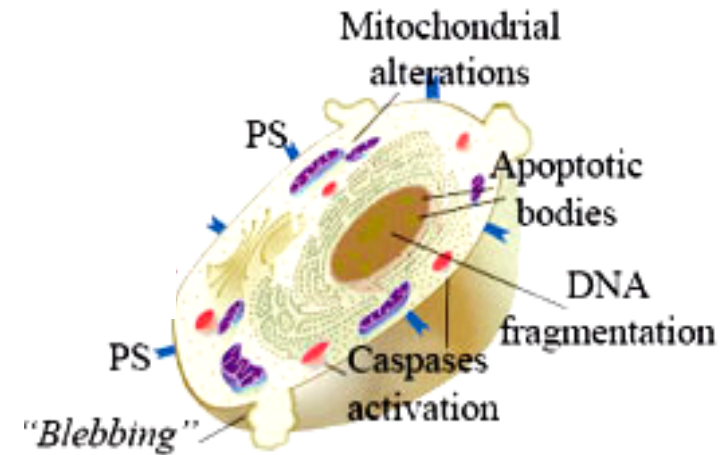
(Lavrik et al., 2010)

**A**

## Dělení kaspáz

(Lavrik et al., 2005)

# Proteolytic activity of caspases is crucial prerequisite for apoptotic phenotype



- Degradation of **structural proteins** - cytoskeleton (e.g. keratins) and nucleus (e.g. nuclear lamins)
  - Plasma membrane blebbing and nuclear condensation
- Exposure of **phosphatidyl serine** at the cell surface
  - Important „eat me” signal for phagocytes
- Cleavage of **negative regulators** of apoptosis and disabling their function (caspase inhibitors, antiapoptotic Bcl-2 family proteins..)
- Activation of important **apoptotic players** by cleavage (Bid, effector caspases...)
- Cleavage of proteins involved in regulation of DNA synthesis, repair, degradation (ATM, ICAD, PARP, polymerases...)
- And many others...

# Kaspázy a nádorové onemocnění

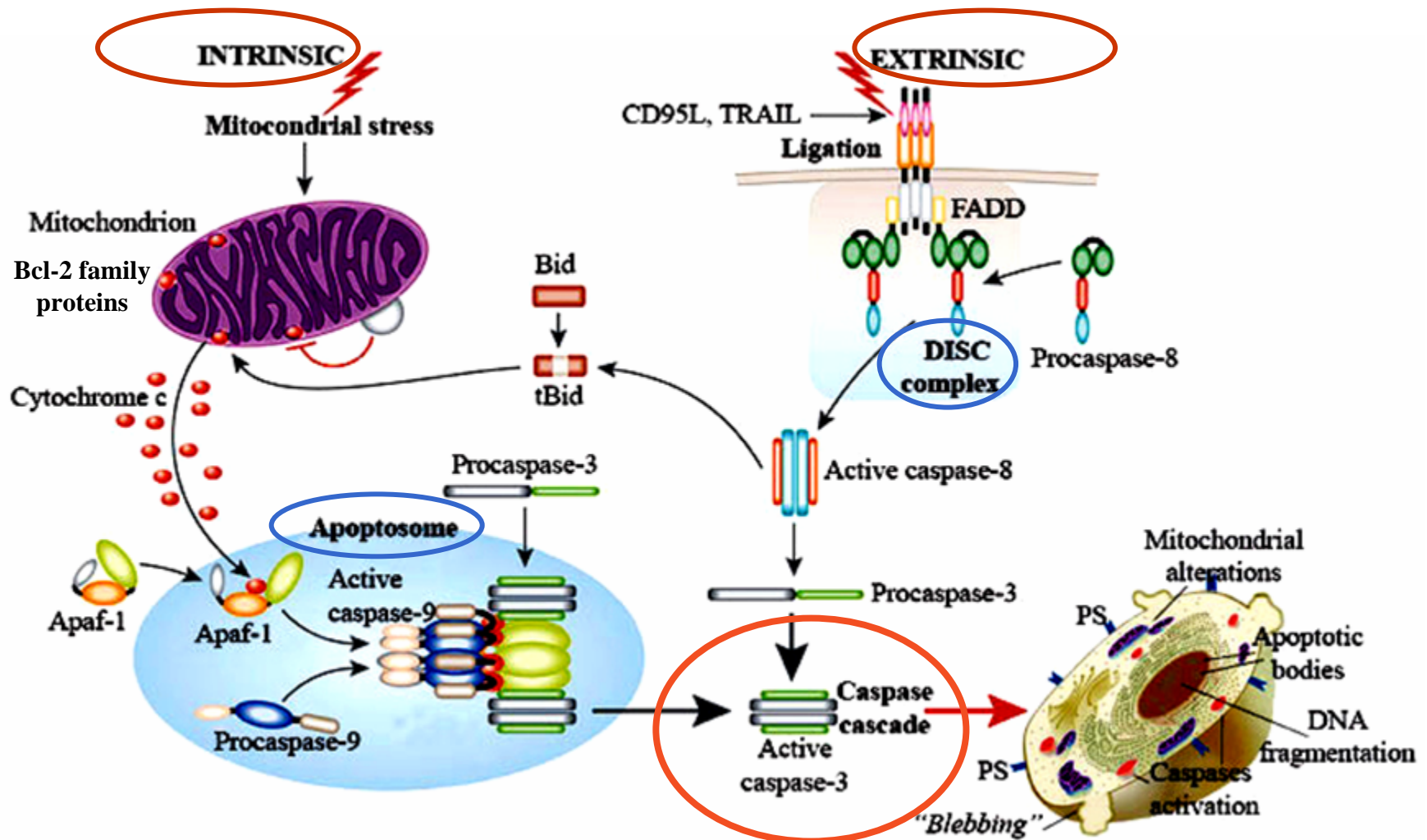
Deregulace na úrovni kaspáz u nádorových buněk

- absence příslušné kaspázy (methylace promotoru atd.)
- mutace kaspáz, nefunkční
- inaktivace v důsledku upregulace přirozených inhibitorů
- bloky v „upstream“ signálních drahách

# Dvě hlavní dráhy indukce apoptózy

- Vnitřní - „intrinsic pathway“ - „mitochondrial pathway“, spouští se uvnitř buňky, klíčová úloha mitochondrií a iniciační kaspázy-9 (-2)
- Vnější - „extrinsic pathway“ - „death receptor pathway“, začíná u povrchových receptorů smrti, klíčová role iniciační kaspázy-8 (-10)
- Centrální molekuly obou drah - **kaspázy** - obě dráhy se „sbíhají“ na úrovni efektorových kaspáz, které dále štěpí specifické substráty v buňce a umožní tak průběh exekční fáze apoptózy
- Možná **interakce** obou drah na různých úrovních v buňce, „cross-talk“

# Dvě hlavní dráhy aktivace kaspáz a spuštění apoptózy

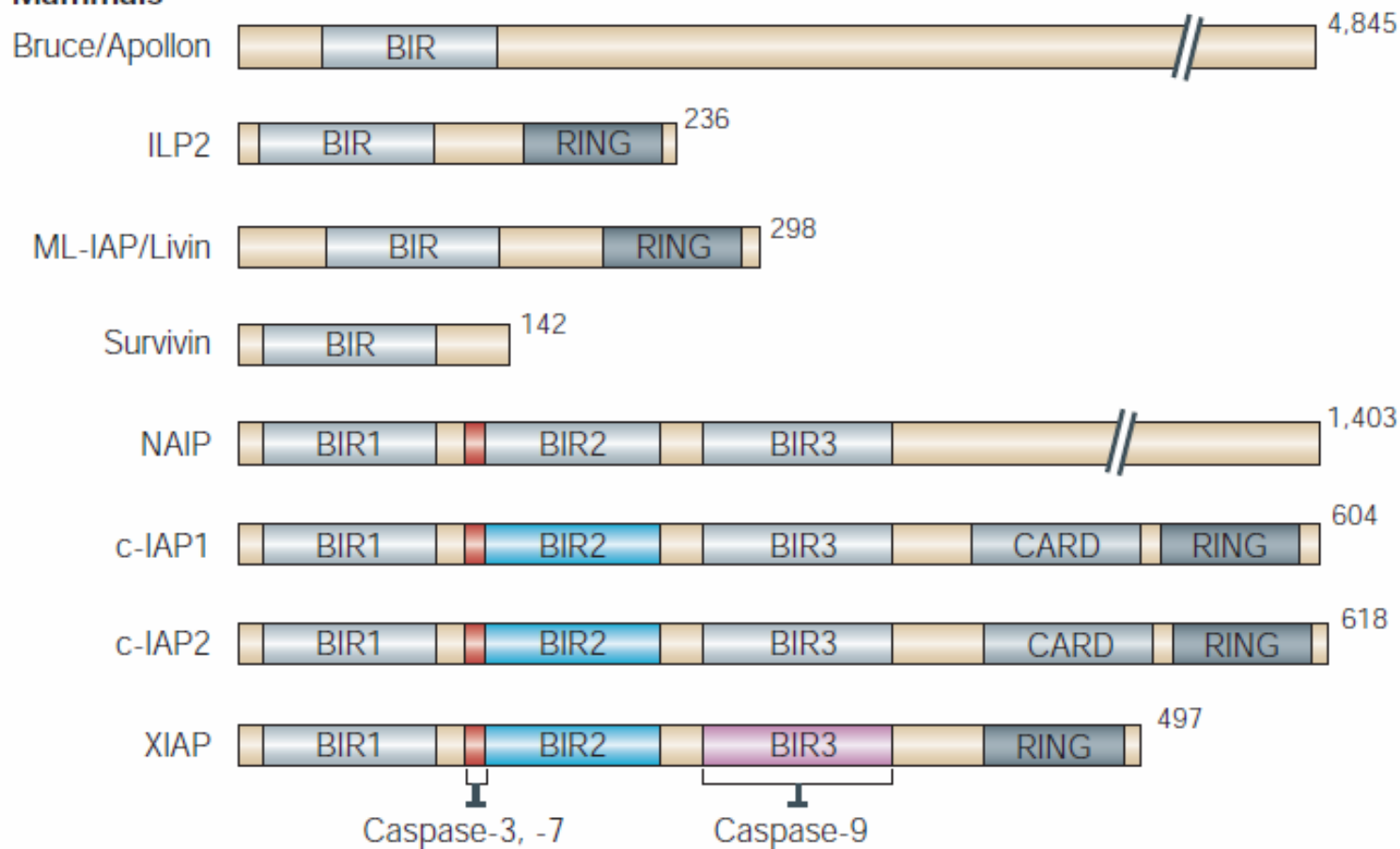


# Endogenní inhibitory kaspáz

- IAPs - „inhibitor of apoptosis proteins“
- cIAP1, cIAP2, XIAP, survivin
  - váží se na prokaspázy a kaspázy a blokují jejich aktivitu, mohou inhibovat jak iniciační, tak efektorové kaspázy - různé mechanismy

# Mammalian IAPs

## Mammals



(Riedl, Shi, 2004)



# Regulace IAPs

- transkripční
- translační
- Posttranslační (ubiquitylace)
- Interakce s jinými proteiny (Smac/DIABLO, Omi/Htra)
  
- Selektivní downregulace IAP:
  - Anti-sense oligonucleotidy
  - Smac mimetics

# Deregulace of IAPs

- IAPs - proteiny efektivně modulující aktivitu iniciačních i efektorových kaspáz, vnější i vnitřní dráhy
- Vážné důsledky deregulací
- Overexprese u řady typů nádorů (inhibice apoptózy)
  - Významná úloha v regulaci vývoje nádorového onemocnění a citlivosti nádorových buněk k terapii
  - Látky schopné inhibice IAPs - slibná protinádorová terapeutika

# IAP antagonists in clinical trials for cancer treatment

- More than 50 patents have been filled during the last ten years aimed in blocking IAP function and stimulate apoptosis
- Trigger autoubiquitinylation and proteasomal degradation of IAPs

Table 1 | IAP antagonists in clinical trials

Organization	Compound name	Condition	Clinical stage
Genentech	GDC-0152	Locally advanced or metastatic solid malignancies, or non-Hodgkin's lymphoma without leukaemic phase	Phase I
Novartis Pharmaceuticals	LCL161	Advanced solid tumours	Phase I
TetraLogic Pharmaceuticals	TL32711	Solid tumours and lymphomas	Phase I
Ascenta Therapeutics	AT-406	Advanced solid tumours and lymphomas	Phase I
Human Genome Sciences	HGS1029	Advanced solid tumours and lymphomas	Phase I

IAP, inhibitor of apoptosis.

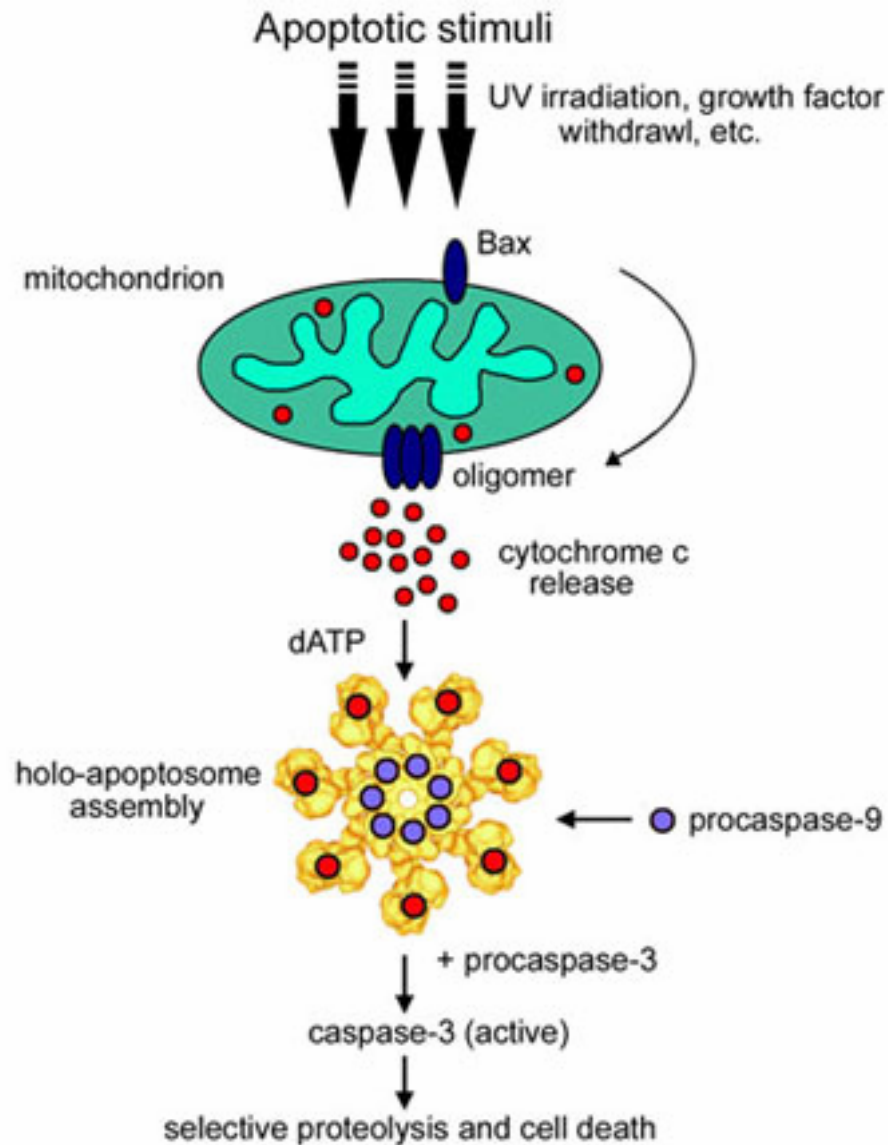
# Vnitřní dráha indukce apoptózy

- **Konvenční radioterapie a chemoterapie**
  - spuštění vnitřní dráhy indukce apoptózy (poškození DNA, aktivace p53 - závislá na p53, aktivace kaspáz a mitochondrií...)
  - neselektivně u nádorových i normálních buněk, časté a četné vedlejší účinky

Příklady chemoterapeutických látek:

- cisplatina, oxaliplatina, etoposid, doxorubicin, 5-fluorouracil atd.

# Vnitřní dráha



# Mitochondrie a apoptóza

- Důležitá úloha mitochondrií v regulaci apoptózy
- Klíčové regulátory v mitochondriích - proteiny rodiny Bcl-2
- Změny na úrovni mitochondriální membrány - membránový potenciál, tvorba pórů, produkce ROS
- Uvolnění proapoptotických proteinů z mitochondrií - cytochrom c, AIF, endoG, Smac/DIABLO, Omi

# Proteiny rodiny Bcl-2

- Důležité regulátory apoptózy na úrovni mitochondrií
- Rodina asi 30 proteinů, pro něž je charakteristická přítomnost tzv. domény BH (Bcl-2 homology), které zprostředkovávají interakce s jejich vazebnými partnery
- Patří sem proteiny jak s proapoptotickou, tak antiapoptotickou funkcí, na jejich rovnováze pak závisí osud buňky

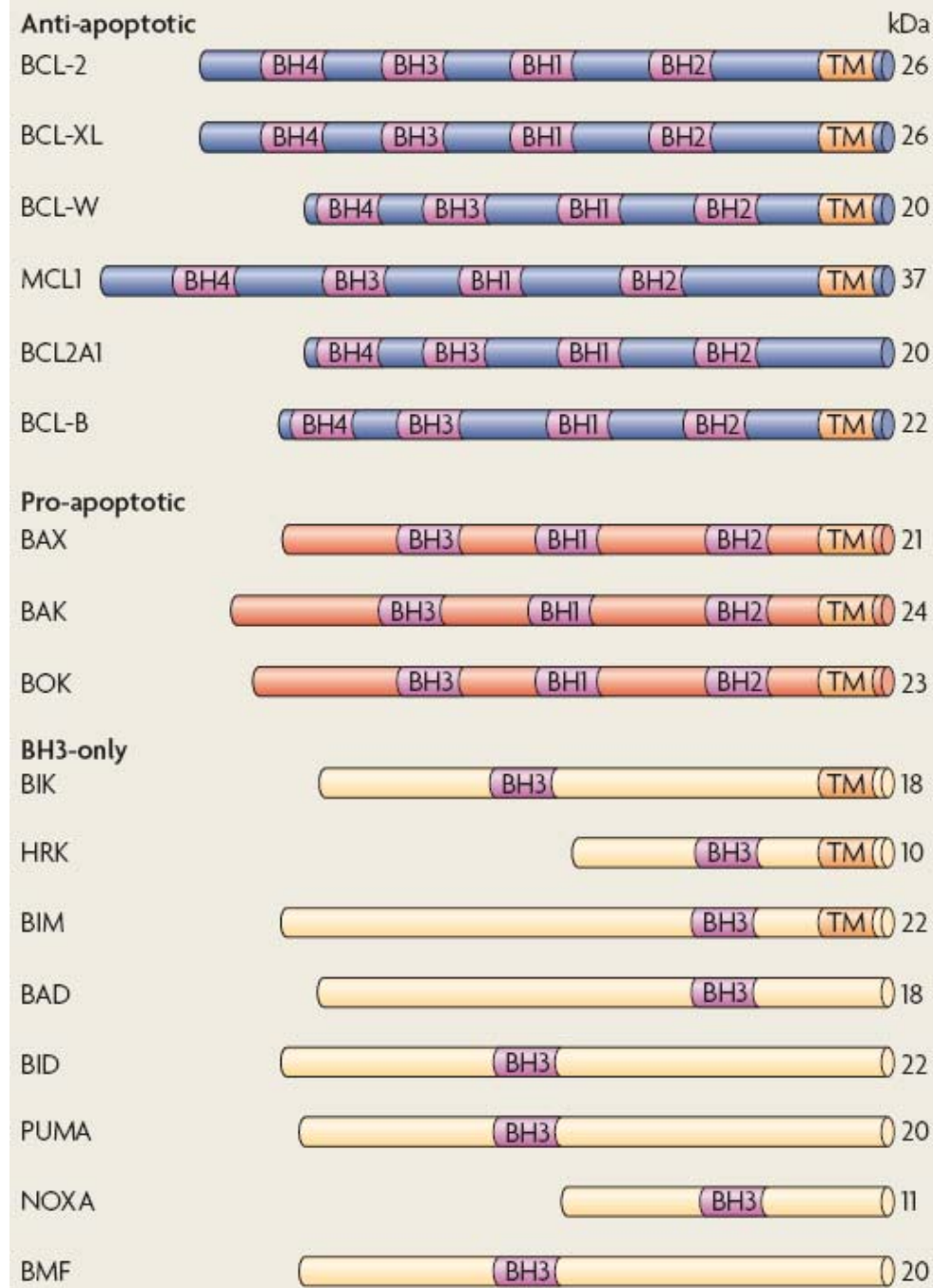
# Bcl-2 family classification

- **Antiapoptotic multidomain**
  - Bcl-2 homology domains BH1-4
  - OMM, cytosol, membrána ER
  - Přímou se váží s proapoptotickými členy rodiny Bcl-2 a chrání integritu OMM
  - Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1
- **Proapoptotic effector**
  - Indukují MOMP a vylití apoptotických mediátorů z mitochondrií
  - Bax, Bak, (Bok)
- **Proapoptotic BH3-only**
  - Bid, Bim, Noxa, Puma, Bmf...



# Proteiny rodiny Bcl-2

Regulace mitochondriální dráhy indukce apoptózy



# Antiapoptotic multidomain Bcl-2 family proteins

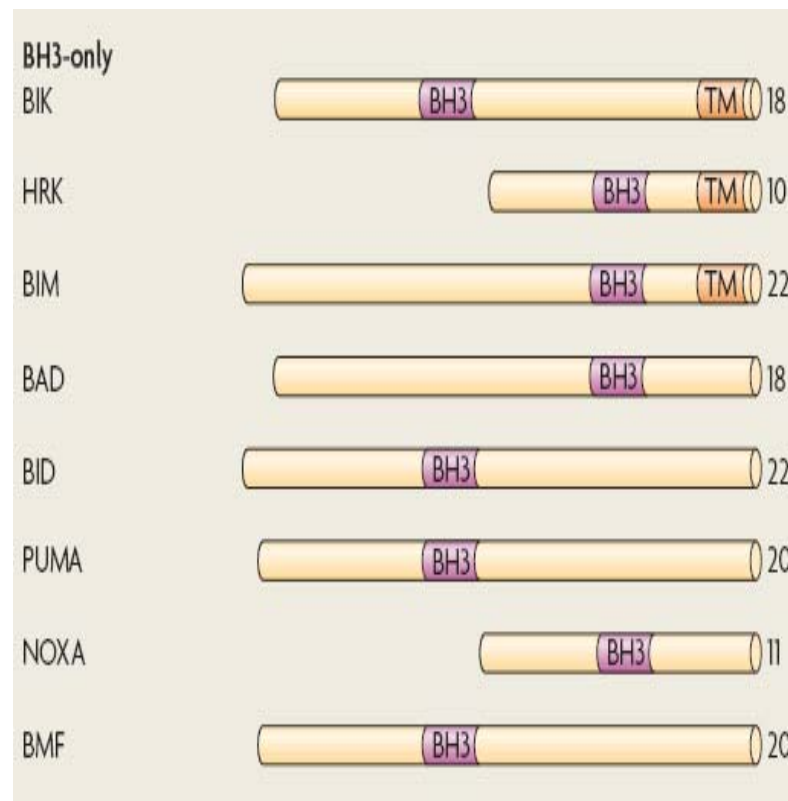
- Blokace mitochondriální dráhy indukce apoptózy
- Interakce s proapoptotickými členy rodiny Bcl-2 a jejich inhibice
- Časté overexprese u řady typů nádorů (hlavně proteiny Bcl-2 a Mcl-1)
  - Nádory pak rezistentní ke konvenčně používané chemoterapii

# „Proapoptotic Bcl-2 family effectors“

- Přímá aktivní úloha v aktivaci mitochondriální dráhy apoptózy
- Stimulace změn v mitochondriální membráně, které vedou k uvolnění proapoptotických mediátorů, formace pórů
- Interakce s antiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2
- Absence nebo inaktivace u některých typů nádorů

# BH3-only proteins

- Aktivovány působením stresu různého druhu
- Účast v řadě signálních drah
- „Signal-specific activation“
- Transkripční nebo posttranslační aktivace
- Stimulace apoptózy v přítomnosti proteinů Bax nebo Bak



# BH3 only proteins classification

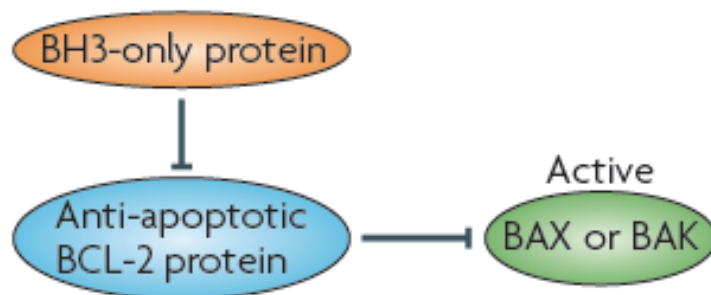
## ■ Sensitizers/derepressors

- Bind only antiapoptotic Bcl-2 family members
- **Bad, Noxa, Puma, Bik, BMF, HRK**

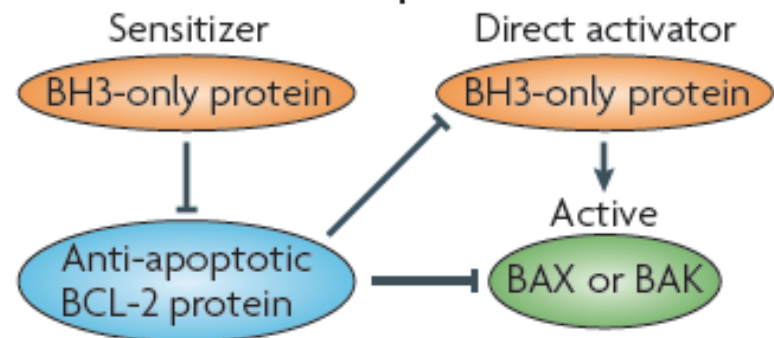
## ■ Direct activators

- Interact with both antiapoptotic and proapoptotic Bcl-2 family proteins
- Can directly activate Bax or Bak and induce MOMP (induce Bax/Bak oligomerization and pore-forming activity)
- **Bid, Bim, (Bok)**

### b Indirect activator model



### Direct activator–derepressor model



# BH3 only proteiny a nádorová onemocnění

- Chrání buňky před maligní transformací
- látky napodobující jejich působení jsou využitelné jako slibná strategie pro posílení účinnosti protinádorové terapie
- **BH3 mimetics**
  - Malé molekuly, které jsou strukturně a funkčně podobné BH3 only proteinům
  - Selectivně specifické pro konkrétní antiapoptotické proteiny
  - Ve fázi klinického a preklinického testování

# BH3 mimetics

## ■ ABT-737

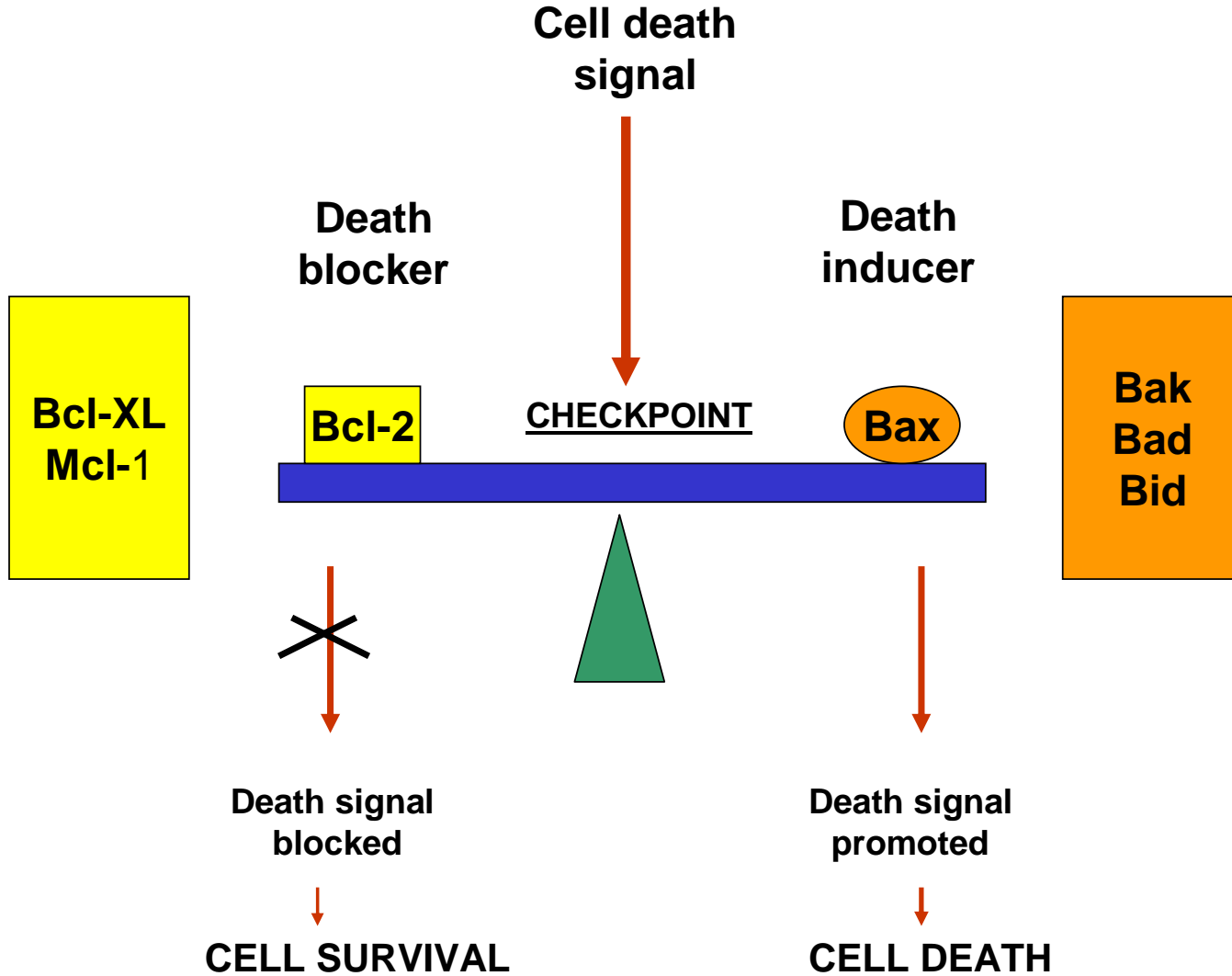
- One of the most advanced and best-characterized BH3 mimetics
- Predominately binds to Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w
- Effective inducer of cell death, especially in tumour cells overexpressing Bcl-2, but only in the presence of Bax or Bak
- Can cooperate with conventional chemo- and radiotherapy in many hematological malignancies and solid tumor

## ■ ABT-263

- Orally available derivative of ABT-737
- Antitumor properties in multiple models
- In clinical trials for lymphocytic leukemia, lymphoma, SCLC

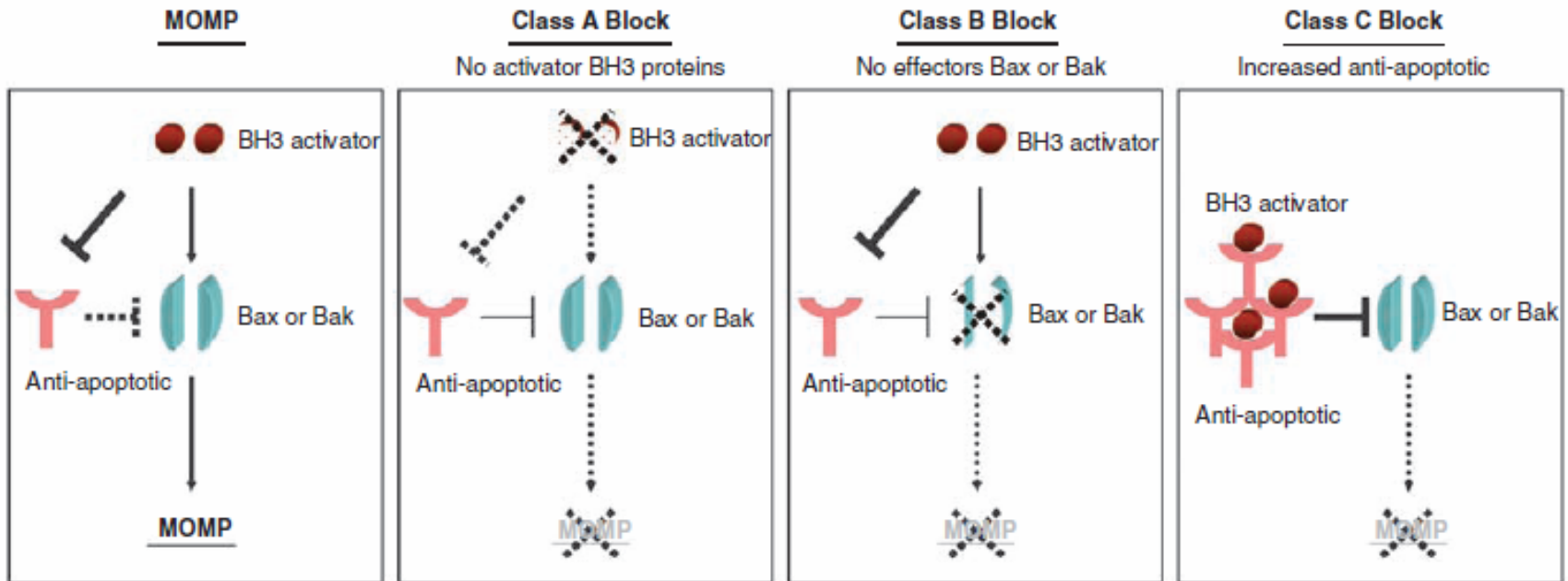
## ■ Gossypol (AT-101)

- Natural phenolic compound found in cotton plants
- Inhibits Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1
- In clinical trials for prostate cancer, lymphocytic leukemia, SCLC





# Bcl-2 family and cancer

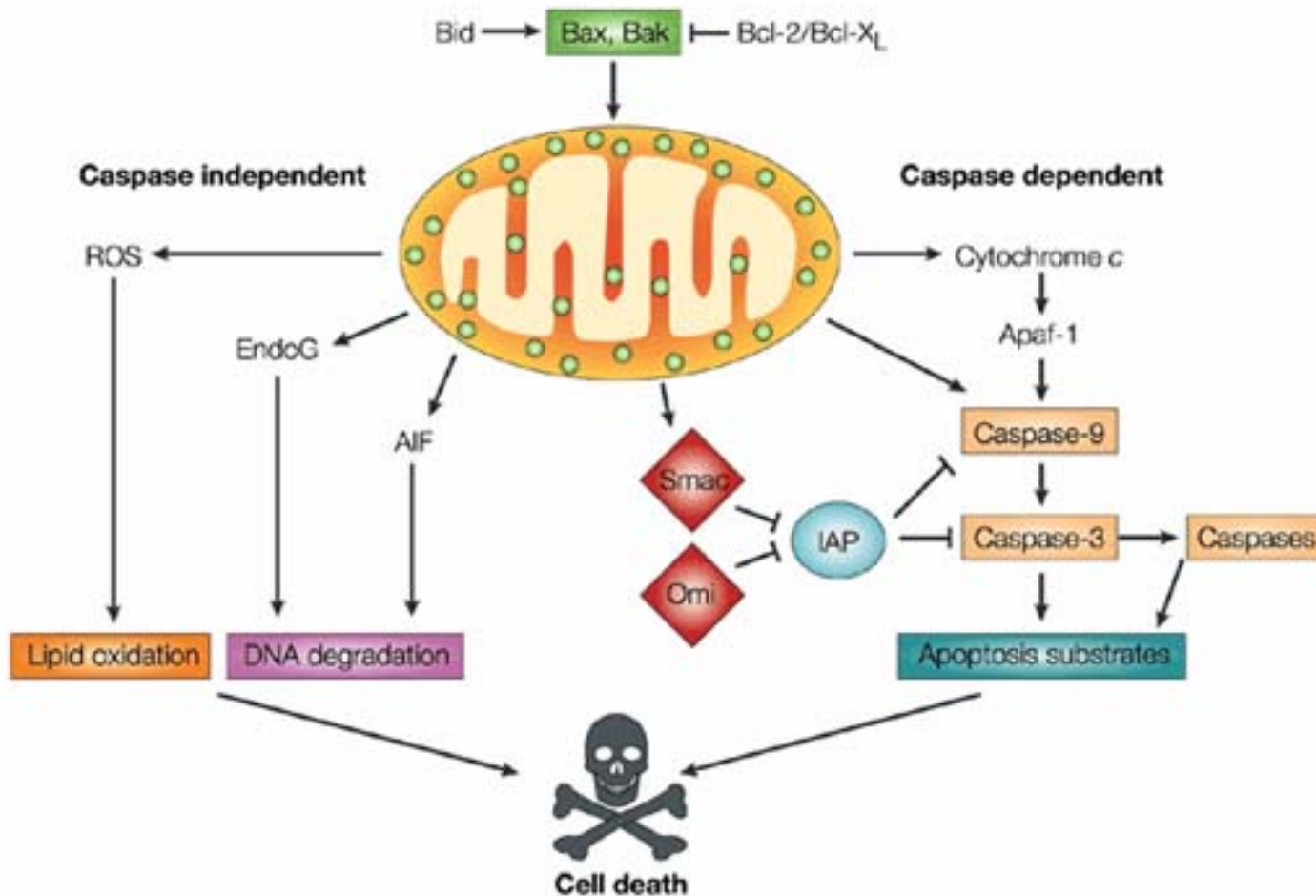


**Figure 3** The apoptotic blocks used by cancer cells. To evade apoptosis, cancer cells select for blocks in apoptotic signaling. These blocks have been categorized based on which group of the BCL-2 family is altered. A class A block is caused by a loss of BH3-only proteins, a Class B block is caused by loss or inactivation of BAX and BAK and a class C block is caused by enhanced expression of anti-apoptotic BCL-2 proteins. After activation and insertion of BAX and BAK into the mitochondrial membrane, the mitochondrial outer membrane is permeabilized (MOMP), enabling the release of cytochrome *c* and activation of apoptosis.

# Mediátory apoptózy uvolňované z mitochondrií

- **Cytochrom c** - aktivace kaspázy-9 na úrovni apoptozomu
- **Smac/DIABLO** - inhibuje IAPs - přispívá tak k aktivaci kaspáz
- **EndoG** - mitochondriální nukleáza, translokuje se do jádra, kde štěpí DNA
- **Omi/Htra** - serinová proteáza, antagonistka některých IAPs
- **AIF** - translokován do jádra, iniciace řady procesů apoptózy včetně např. kondenzace chromatinu

# Mechanismus působení Smac/DIABLO a Omi/Htra2



(Jin, Reed, 2002)

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Hyršlová Vaculová A., 2012

# Smac/DIABLO

- **Smac**: second mitochondria-derived activator of caspases (first was cytochrom c)
- **DIABLO**: Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOW pI)
  
- Po působení apoptotického stimulu je uvolňován z mitochondrií a spouští apoptotické signálování
- **inhibuje cIAPs (XIAP, cIAP1/2)**
- Posílení exprese Smac vede ke zvýšené citlivosti nádorových buněk k apoptóze
- Vývoj peptidů a malých syntetických molekul, které napodobují funkce Smac v buňce a podporují indukci apoptózy
  - Eliminace nádorových buněk, jejich zcitlivění k účinkům protinádorové terapie

# Cytochrome c

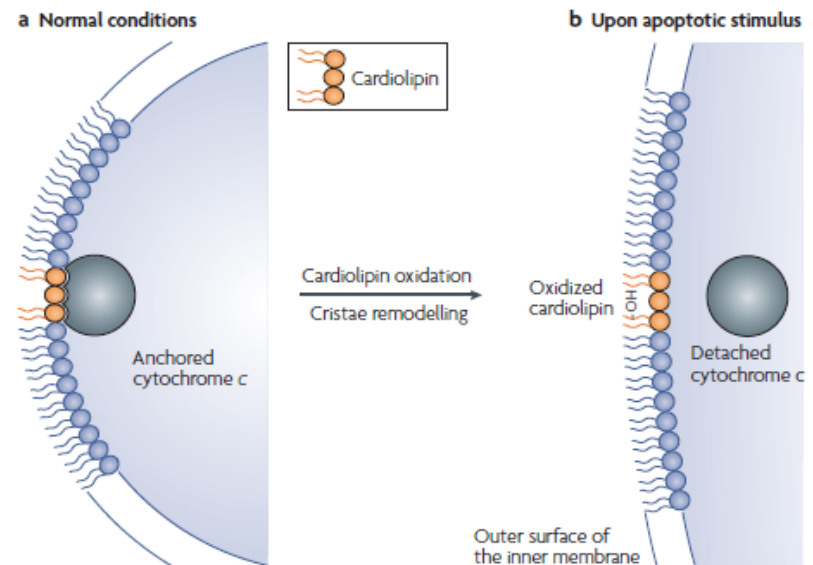
- The role of cytochrome c in apoptosis was first described when addition of dATP to cytosolic extracts induced caspase activity

(Liu et al., 1996)

- Microinjection of cytochrome c into cytoplasm of mammalian cells induces apoptosis

- Cytochrome c -deficient cells were resistant to many apoptotic stimuli, and showed decreased caspase-3 activation

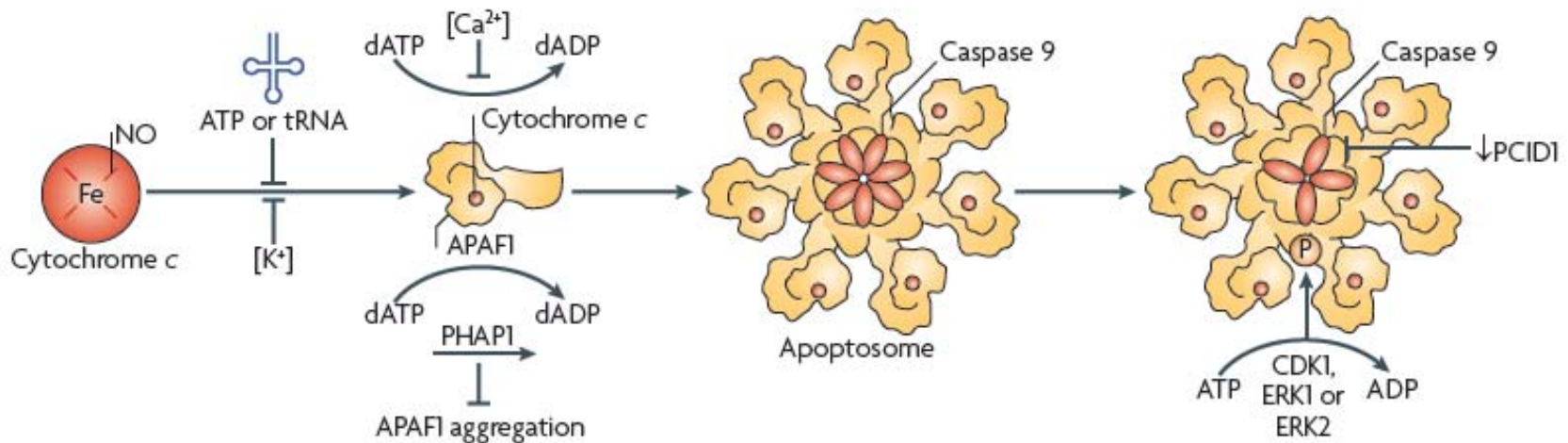
- In mitochondrial membrane cytochrome c is associated with cardiolipin, oxidation of cardiolipin disrupts the interactions, which leads to cytochrome c release



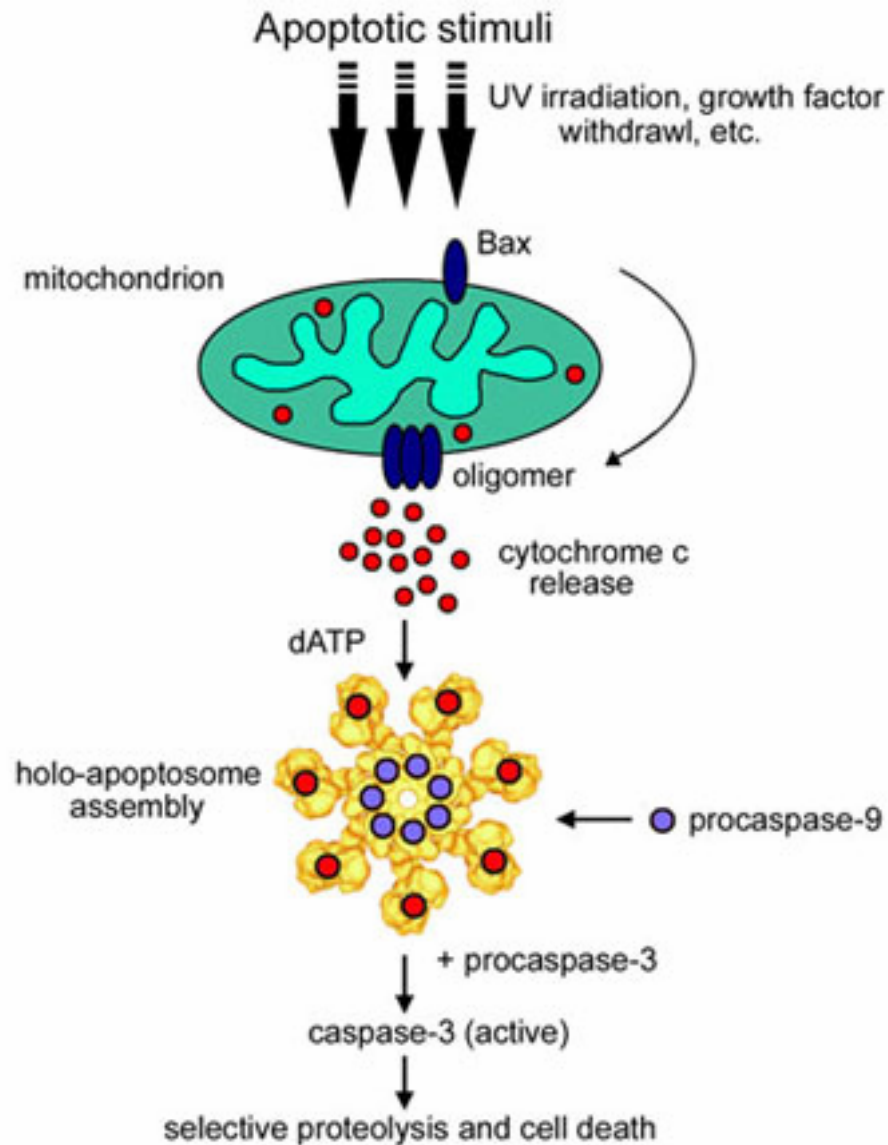
(Yong-Ling et al., 2008)

# Apoptozom

- Multiproteinový komplex složený z cytochromu c, Apaf-1, ATP, kaspázy-9
- slouží jako platforma pro aktivaci kaspázy-9
- funkce závisí na dodání energie (ATP)



# Vnitřní dráha



# Vnější dráha indukce apoptózy

- Novější přístupy - spuštění vnější dráhy indukce apoptózy, specificky přes povrchové receptory, výhody:
  - nezávislost na p53
  - vyšší selektivita
  - nižší vedlejší účinky

Více než 50% nádorů - mutace p53, pro tyto nádory se jeví indukce apoptózy přes povrchové receptory velmi slibnou, výborná alternativa ke konvenčním terapeutickým přístupům



# Apoptóza zprostředkovaná přes povrchové receptory smrti

- Tzv. „death receptory“ - receptory smrti, přes ně dochází ke spuštění apoptózy indukované tzv. ligandy smrti - „death ligands“
- Patří do rodiny TNF (tumor necrosis factor)
- Obsahují tzv. „death doménu“, která umožní pokračování přenosu apoptotického signálu (vazba s dalšími členy signální dráhy)

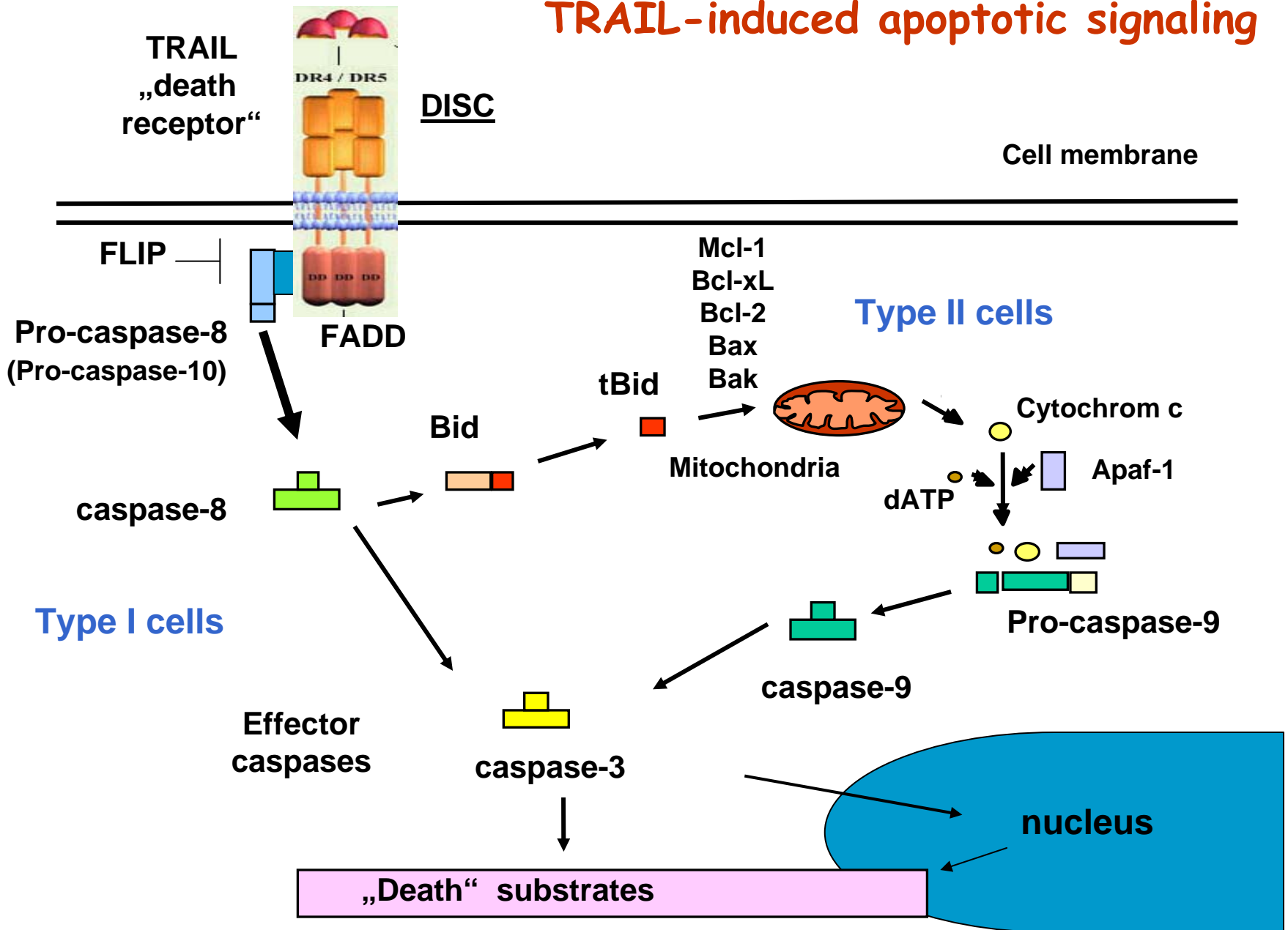
# Aplikace TRAILu - atraktivní cílený přístup v protinádorové terapii

Výhodné vlastnosti - selektivita pro nádorové buňky, nízká toxicita pro zdravé buňky organismu, ale:

Poslední dobou se ukazuje, že řada nádorových buněk je rezistentní k apoptóze indukované TRAILem

popis signálních drah TRAILu je proto velmi důležitý pro pochopení mechanismu působení, mechanismů rezistence a pro správné zacílení protinádorové terapie

# TRAIL-induced apoptotic signaling

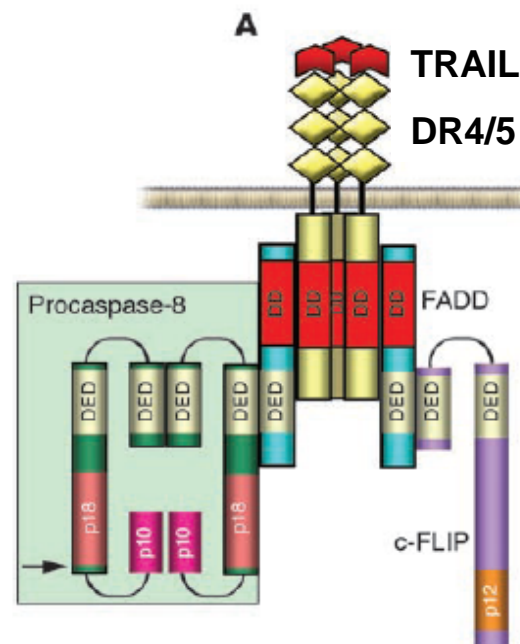
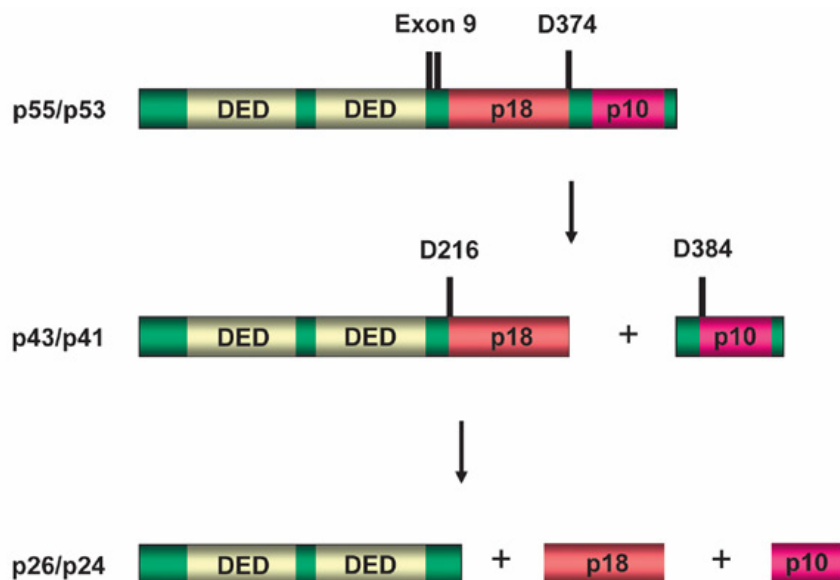


# Kaspáza-8

- Naprosto klíčová molekula v přenosu apoptotického signálu TRAILu z receptorů do nitra buňky
- Po vazbě TRAILu na DRs dochází k tvorbě DISCu, vazbě pro-kaspázy-8 do DISCu (přes protein FADD) a její aktivaci
- Iniciační kaspáza, aktivovaná ve dvou krocích, autokatalytické štěpení
- Kompetitivně inhibovaná pomocí cFLIP
- Množství aktivované kaspázy-8 je klíčové pro další osud buňky
  - **Hodně aktivní kaspázy-8** - přímé štěpení kaspázy-3 a exekuce apoptózy (buňky typu I)
  - **Málo aktivní kaspázy-8** - nutná amplifikace apoptotického signálu přes mitochondrie, kaspáza-8 štěpí protein Bid, ten translokován do mitochondrií, spuštění dráhy (buňky typu II)

# Specifické štěpení kaspázy-8

## dva hlavní kroky



(Lavrik et al., 2005)

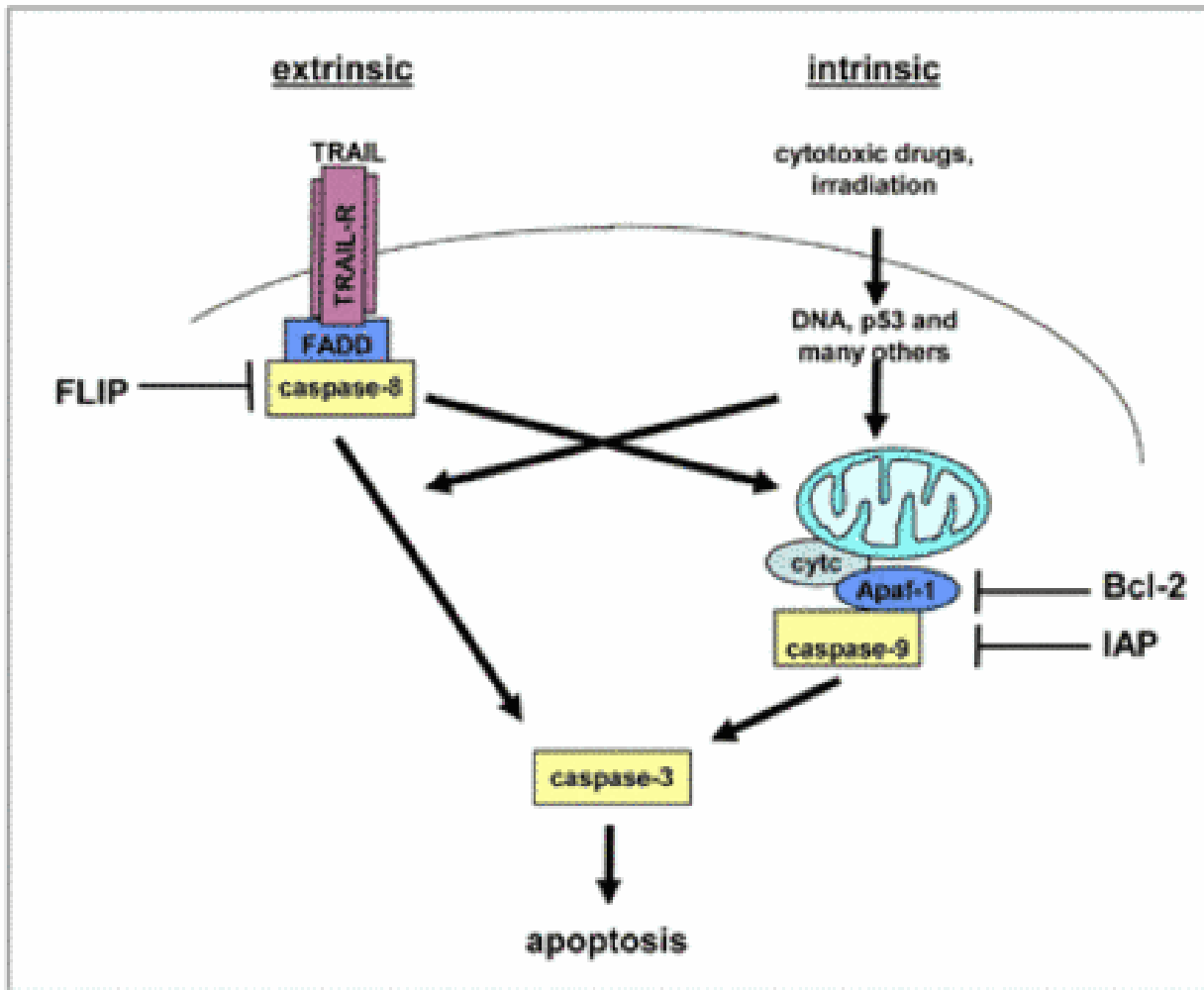
Hyršlová Vaculová A., 2012

# cFLIP a nádory

- U řady typů nádorů je zvýšená exprese proteinu cFLIP
- Rezistence k apoptóze zprostředkované přes povrchové receptory
- Modulace anti-apoptického signálování (NF- $\kappa$ B, Akt/PKB, MAPK)

V řadě případů se ukazuje, že monoterapie využívající TRAIL je nedostačující - velká šance ve využití kombinované terapie - TRAIL + chemoterapeutické látky

# Kombinovaná terapie

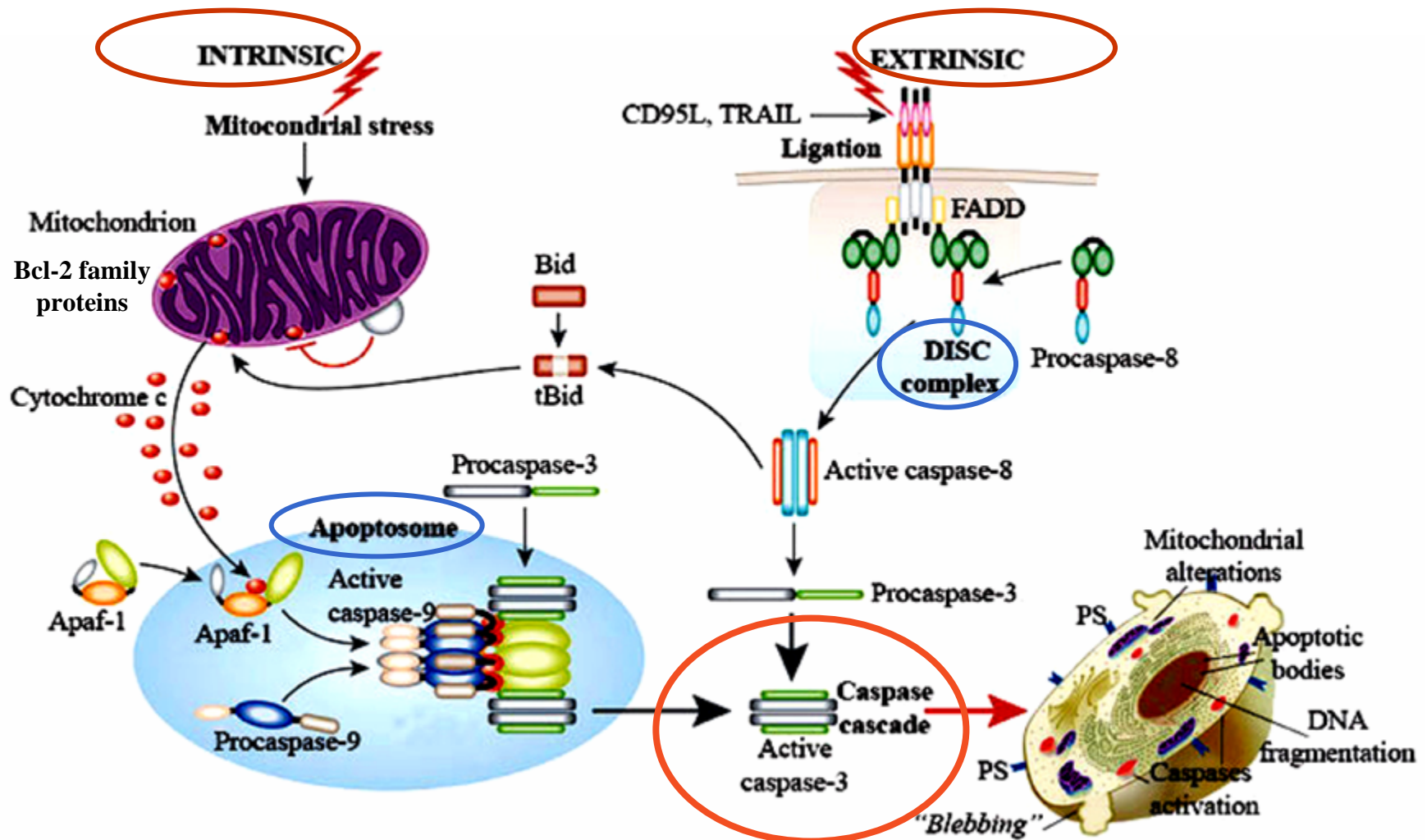




# Kombinovaná terapie

- TRAIL + chemoterapie/radioterapie
- Chemoterapeutické látky zvyšují citlivost nádorových buněk k apoptóze indukované TRAILe
  - Pomocí různých molekulárních mechanismů
  - Na různých úrovních signální dráhy TRAILu
  - S ohledem na typ použitého chemoterapeutika (koncentrace, aplikační schema atd.)
  - S ohledem na typ léčeného nádoru, typ buněk
  - S ohledem na typ rezistence buněk atd. (type I, II)

# Two main routes of caspase activation and apoptosis triggering



# Kontrola aktivace kaspáy probíhá na několika úrovních

- cFLIP
- cIAPs
  - XIAP, cIAP1, cIAP2, survivin
- inhibitors of IAPs -
  - Smac/DIABLO, Omi/Htra
- Bcl-2 family proteins
  - proapoptotic - Bid, Bax, Bak, Bim, Bad
  - antiapoptotic - Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1

- Které molekuly zapojené v regulaci apoptózy jsou nejslibnějším cílem protinádorové terapie a proč?

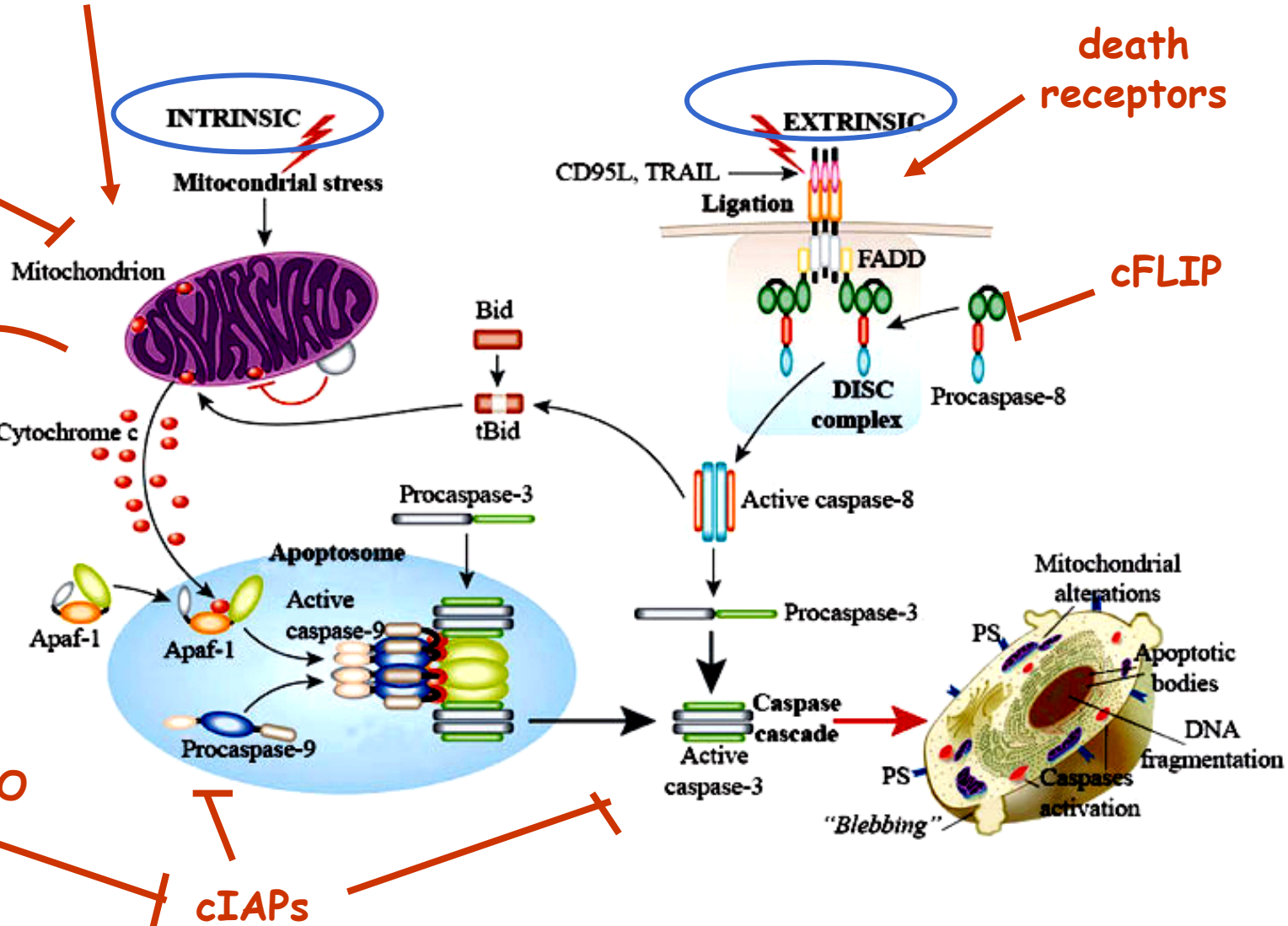
# Multiple control of caspase activation

proapoptotic Bcl-2 family proteins  
(Bax, Bak)

antiapoptotic Bcl-2 family proteins  
(Bcl-2, Mcl-1)

death receptors

(Bcl-2, Mcl-1)



# Deregulation of apoptosis in cancer cells

- Typical characteristics of cancer cells - deregulation of apoptosis, „wrong apoptotic program“
  - suppression of spontaneous apoptosis
    - survival advantage of tumour
  - resistance to the effects of apoptosis inducers
- Goal of anticancer therapy
  - selective elimination of cancer cells by reactivation of apoptotic program,
  - without any harm to normal surrounding tissue

Search for and testing agents with the ability to effectively trigger apoptosis signaling pathways in cancer cells

# BH3 mimetics

Antisense oligonucleotides (Bcl-2, Mcl-1)

proapoptotic Bcl-2 family proteins

antiapoptotic Bcl-2 family proteins

DR activation and/or upregulation

death receptors

cFLIP

cFLIP antisense

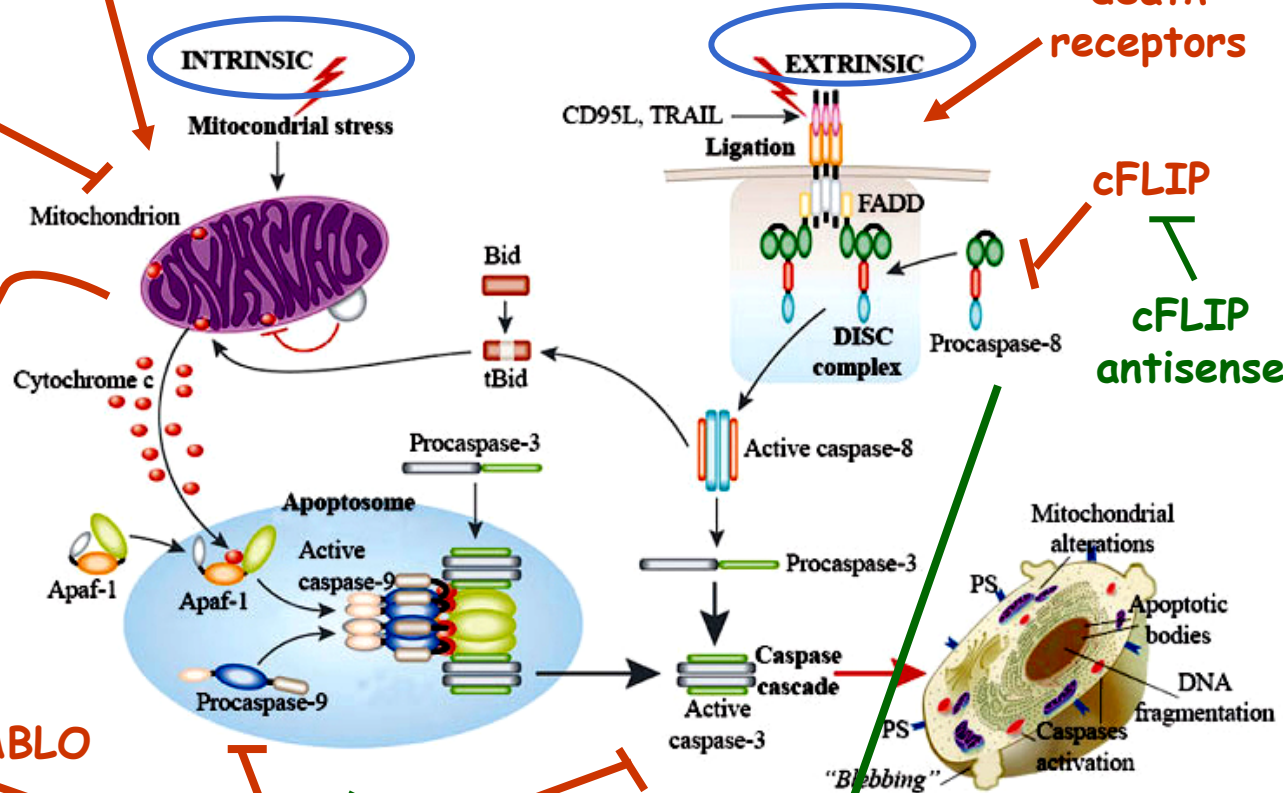
Strategies for apoptosis triggering in cancer cells

Smac/DIABLO

Smac mimetics  
XIAP antisense  
IAP inhibitors

cIAPs

Caspase reactivation/reexpression





# Main goals of anticancer research

- **Reactivation of apoptotic program** in cancer cells resistant to killing
- Identification of the **specific blocks** in apoptosis pathways in cancer cells
- **Selective targeting** of cancer cells at the level of the specific signaling molecules
- **Testing killing efficiency** of novel and conventionally used chemotherapeutic drugs
- Increase effectiveness of therapy by **combination of anticancer drugs** (as monotherapy is often insufficient)



- Které molekuly zapojené v regulaci apoptózy jsou nejslibnějším cílem protinádorové terapie a proč?

# Mechanismy buněčné smrti, význam, metody

**Bi8870**

**RNDr. Alena Hyršlová Vaculová, Ph.D.**

... vždy v jarním semestru, 2 hodiny týdně

# Děkuji za pozornost!

Vaše případné dotazy směřujte na adresu:

[vaculova@ibp.cz](mailto:vaculova@ibp.cz)